



FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

Priority Certificate of Filing of a Patent Application

Application Number: 100 15 797.1

Date of Filing: 28 March 2000

Applicant/Owner: Felix Hausch and Andres Jäschke,
Berlin/DE

Title: Multiplex Analysis of DNA Mixtures Using
Photolytically Readable DNA Chips

IPC: C 12 Q, C 07 H, G 01 N

**The accompanying pages are a proper and exact reproduction of
the original documentation of this patent application.**

Munich, 22 March 2001

German Patent and Trademark Office

Signing for the President of the German Patent Office

Jerofsky



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 15 797.1

Anmeldetag: 26. März 2000

Anmelder/Inhaber: Felix Hausch und Dr. Andres Jäschke,
Berlin/DE.

Bezeichnung: Multiplex-Analyse von DNA-Gemischen mittels photo-
lytisch ablesbarer DNA-Chips

IPC: C 12 Q, C 07 H, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. März 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Jerofsky



~~BELEGZUSCHRIEB~~

Darf nicht geändert werden

5

Multiplex-Analyse von DNA-Gemischen mittels photolytisch ablesbarer DNA-Chips

Beschreibung:

Die vorliegende Erfindung beinhaltet die Analyse von komplexen Nukleinsäuregemischen in einem einzigen Reaktionsschritt. Dies geschieht durch sequenzspezifische Modifizierung eines Arrays aus photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden. Diese können anschließend mit einem Laserstrahl abgelesen und massenspektroskopisch ausgewertet werden.

Stand der Technik:

Mit der ständig steigenden Sequenzinformation aus den verschiedenen Sequenzierungsprojekten und der wachsenden Anzahl vollständig bekannter Genome verlagern sich genetische Untersuchungen zunehmend auf reproduzierende oder sekundäre Sequenzanalysen, die auf bekannten Sequenzen aufbauen. Zur Zeit sind die Genome von über 25 Organismen vollständig bekannt, das menschliche Genom und viele weitere werden in den nächsten Jahren hinzukommen. Die dabei gewonnenen Informationen lassen sich vielfach direkt zur Analyse bestimmter Merkmale ausnutzen, z.B. zum Nachweis von Sequenzen, die für Krankheitserreger spezifisch sind. Genetisch bedingte oder prä-dispositionierte Krankheiten können oft auf spezifisch mutierte Genabschnitte zurückgeführt werden. So kennt die Humanmedizin schon heute weit über 3000 monogene Krankheiten, die durch Veränderung einzelner Gene ausgelöst werden. Z.T. kann ein pathogenes Merkmal auf die Mutation eines einzigen Nukleotides zurückgeführt werden. Im Zuge des Human-Genom-Projektes (HUGO) wird diese Zahl weiter wachsen und durch multigenetische Faktoren erweitert werden.

Die wachsende Zahl an relevanten Genmarkern setzt neue Anforderungen an die Diagnostik von Nukleinsäuren. Die klassische Sequenzierung nach der Sanger-Methode, die bei der ursprünglichen Sequenzierung der bisher bekannten Genome angewendet wurde, ist hierbei ungeeignet, da sie zeitaufwendig und nicht vollständig automatisierbar ist.

Mit der Entwicklung von schonenden Massenspektroskopie-Methoden, die eine Analyse von großen, intakten Biomolekülen erlauben, bietet sich hier eine vielversprechende Alternative. So kann durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) direkt das Molekulargewicht von Nukleinsäuren bestimmt werden (Hillenkamp und Karas, 1990, Methods in Enzymol., 280). Im Gegensatz zur klassischen Sanger-Sequenzierung durch PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wird dabei die Sequenz-spezifische Fragment-Leiter einer DNA-Probe mit einer einzigen

25.10.00 67

Massenbestimmung ermittelt. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur Sequenzierung des menschlichen p53-gens eingesetzt (Fu et al., 1998, Nat. Biotechnol., 381), eine entsprechende Vorrichtung hierfür ist in US 96/710565 (F. Hillenkamp, 1996) vorgeschlagen. Durch Verbesserung der Messbedingungen (schonendere Anregung im IR-Bereich, neutrale Matrix) ist es in letzter Zeit möglich geworden, weit größere DNA-Moleküle mit über 2500 Nukleotiden zu vermessen (Berkenkamp et al., 1998, Science, 260). Dadurch sollte sich der Leserahmen sowie die Messgenauigkeit bei der massenspektroskopischen Sequenzierung deutlich verbessern (PCT/US99/10251, WO 99/57318). In dieser Hinsicht sind auch die Verwendung von stabileren oder isotoopenreinen Nukleotidanaloga zu erwähnen (PCT/GB 96/00476, WO 96/27681, I. Gut et al.). Ein Verfahren zur genaueren massenspektroskopischen DNA-Sequenzierung durch internes Kalibrieren ist in PCT/BG 94/02527 (WO 95/14108, M. A. Reeve et al) vorgeschlagen.

Die Diagnostik bereits bekannter Gene ist durch die Entwicklung sogenannter DNA-Chips erheblich vereinfacht worden (Gerhold et al., 1999, Trends In Biochemical Sciences, 168-73). Dabei sind Oberflächen mit Oligonukleotiden funktionalisiert, die zu dem zu untersuchenden genetischen Material komplementär sind. In der Regel sind die Oligonukleotid-Marker in einem Array-Format angeordnet, so dass durch die Hybridisierung an einer bestimmten Position auf die Präsenz der entsprechenden Sequenz innerhalb der biologischen Probe geschlossen werden kann (Fodor, 1997, Science, 393-395). Die Auswertung der Hybridisierungstests erfolgt in der Regel über Fluoreszenzmarkierung der Proben und ein Scannen des DNA-Chips. Der große Vorteil der DNA-Analyse mittels DNA-Chips ist der hohe Durchsatz: So können auf einem 1,6x1,6cm Chip bis zu 137.000 Oligonukleotide platziert und innerhalb von 10 Minuten abgelesen werden (Chee et al., 1996, Science, 610-614). Die Fluoreszenz-Analyse der hybridisierten Proben erlaubt jedoch keinen weiteren Informationsgewinn über die Zielsequenz, zudem ist die Hybridisierungseffizienz abhängig von der jeweiligen Basenzusammensetzung und wird auch maßgeblich von Sekundärstrukturen beeinflusst, so dass in der Regel nur relative Aussagen gegenüber internen Referenzen möglich sind. Außerdem werden einzelne Fehlpaarungen toleriert, die nur durch umfangreiche Kontrollexperimente ausgeschlossen werden können.

Die massenspektroskopische Auswertung von DNA-Chips bietet generell den Vorteil, daß sie neben der Präsenz der untersuchten Nukleinsäure zusätzliche Information durch das Molekulargewicht liefert. Diese „dritte“ Dimension der Messung (neben der zweidimensionalen Position auf dem Chip) kann zur internen Kontrolle der hybridisierten DNA-Proben herangezogen werden. Auch bei der massenspektroskopischen Sequenzierung

von DNA wurde dies bereits zur zusätzlichen Kontrolle der gemessenen Nukleinsäurefragmente und zur Interpretation der beobachteten Sequenzierleiter ausgenutzt (Kirpekar et al., 1998, Nucleic Acids Res., 2554-2559).

Da bei MALDI-TOF-Messungen die Nukleinsäure-Fragmente auf einer flachen Oberfläche präsentiert werden, eignet sich diese Methode besonders gut zur schnellen Auswertung von Nukleinsäure-Chips. Die zu untersuchenden Nukleinsäuren werden zunächst in einer festen, organischen Matrix eingeschlossen, welche anschließend durch Laserbeschuss von der Oberfläche desorbiert werden. Dabei werden isolierte Nukleinsäuren als Matrixcluster mit in die Gasphasen gerissen, von der sich ablösenden organischen Phase ionisiert und anschließend anhand der charakteristischen Flugzeit im elektrischen Feld nachgewiesen. Durch die Anregung mit einem Laser lassen sich gezielt einzelne Punkte innerhalb des DNA-Arrays auswerten. Ein solches Konzept ist in PCT/US 94/00193 (WO 94/16101, H. Köster) beschrieben, bei dem die zu untersuchenden Proben auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert werden und anschließend mit einem Oligonukleotid-Marker inkubiert werden. Diese Sonden werden ggf. sequenz-spezifisch modifiziert, bevor sie MALDI-TOF-massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Dies setzt eine separate Aufreinigung und gezielte Platzierung für jede der zu untersuchenden DNA-Proben voraus. Bei der Menge der zu untersuchenden Proben – z.B. alle relevanten, bisher bekannten 3000 Punktmutationen – ist dies mit erheblichem Aufwand verbunden. Es wurden daher Nukleinsäure-Modifikationen vorgeschlagen, die eine kovalente Immobilisierung der Proben auf dem Chip erleichtern (O'Donnell et al., 1998, PCT/US97/20195, WO 98/20020). Als zusätzliche Modifikation wurden auch photospaltbare Bausteine für MALDI-TOF-Messungen beschrieben (Olejnik et al., 1998, Nucleic Acids Res., 3572-3576), die eine lichtgesteuerte Freisetzung der Proben erlaubt. Ähnlich wurde die Verwendung von Photospaltstellen in (Koster et al., 1998, PCT/US97/20444, WO 98/20166) vorgeschlagen, um die Nachweisreaktionen für jede Probe einzeln durchzuführen und diese Reaktionsansätze in einem Arrayformat auf einen MALDI-TOF-geeigneten Chip zu spotten. Dabei erlaubt eine funktionelle Gruppe der Nukleinsäure-Sonden die spezifische Aufreinigung an einer speziell präparierten Oberfläche und die Photospaltstelle anschließend eine photolytische Freisetzung zur MALDI-TOF-Detektion.

Der Einsatz von spaltbaren Primern als DNA-Sonden zur massenspektroskopischen Sequenzierung ist ferner in PCT/US 96/06116 (WO 96/37630, J. A. Monforte et al.) vorgeschlagen worden, wobei dies zur Verkürzung der zu messenden Nukleinsäure-Fragmente und damit zu einem verbesserten Leserahmen führen sollte. Der Einsatz von immobilisierten Primern in einer Zweischritt-Amplifikation ist in DE 19710166 (Gut, I und

Franzen, J.; 1998) beschrieben zu dem Zweck, die hochparallele Bearbeitung von Nukleinsäuren an magnetischen Partikeln zu beschleunigen und ggf. zu automatisieren.

Kovalent immobilisierte Oligonukleotid-Sonden bieten generell den Vorteil der verbesserten und einfacheren Handhabung. So sind verschiedenste Reaktionsbedingungen wie z.B. denaturierendes Waschen oder Temperatursprünge möglich, die insbesondere bei enzymatischen Reaktionen an fester Phase notwendig werden. Kovalent immobilisierte Sonden sind jedoch nicht für eine MALDI-TOF-Analyse zugänglich, da sie nicht von der Oberfläche desorbieren können.

Der Nachweis von Nukleinsäuren durch Hybridisierung bietet die einzigartige Möglichkeit, gemäß der Watson-Crick-Basenpaarungsregel komplementäre Oligonukleotid-Sonden für jede beliebige Zielsequenz zu generieren. Zumindest aus biologischer Sicht ist diese Interaktion jedoch relativ unspezifisch. So werden einzelne Fehlpaarungen toleriert oder können durch Nebeneffekte wie außergewöhnlich stabile Sekundär-Strukturen, hoher G/C-Anteil etc. überlagert werden. Gerade beim Sequenzieren oder bei dem Nachweis von Mutationen einzelner, entscheidender Nukleotide (SNP) ist jedoch eine reproduzierbare und verlässliche Auflösung einzelner Basen entscheidend. Enzymatische Transformationen sind hier der einfachen Hybridisierung eindeutig überlegen. So schneiden Restriktionsenzyme nur die jeweilige Erkennungs-Sequenz an einer definierten Position abhängig vom Methylierungsmuster. Endonukleasen hydrolysieren bevorzugt einzelne Nukleotide und DNA-Ligasen sind extrem sensitiv für perfekte Basenpaarung an der Ligationsstelle. DNA-Polymerasen besitzen oft eine zusätzliche Proof-Reading-Aktivität, mit der sie eigene Fehler korrigieren. Dieses Prinzip wird bei klassischen DNA-Nachweisverfahren wie der Polymerasekettenreaktion (PCR), Ligasekettenreaktion (LCR), dem RNA-footprinting oder der Sanger-Sequenzierung angewendet.

Auch für den Nachweis von immobilisierten Nukleinsäuren wurden enzymatische Modifikationen zur spezifischen Detektion einzelner Nukleotide vorgeschlagen (GB 2308188, Minter, S. J., 1997). In (Koster et al., 1998, PCT/US97/20444, WO 98/20166) erfolgt die Detektion der modifizierten Oligonukleotid-Sonden durch Massenspektroskopie. In beiden Fällen ist dabei die zu untersuchende Zielsequenz an der festen Phase immobilisiert, so dass diese vor jedem Nachweis auf die Oberfläche aufgebracht werden muss. Wird die Oligonukleotid-Sonde immobilisiert, so geschieht dies nach der Modifikation zur einfacheren Aufreinigung.

Mit zunehmender Kenntnis der genetischen Faktoren, die für bestimmte Veranlagungen, Krankheiten oder für ein gesundheitliches Risiko verantwortlich sind, wächst die Zahl der

relevanten Nukleotide, die innerhalb einer biologischen Probe zu überprüfen sind. Bei enzymatischen Nachweisen setzt dies klassisch eine Reaktion und Detektion pro Zielsequenz voraus. Selbst bei Automatisierung und paralleler Probenbearbeitung mit extrem hohem Durchsatz führt dies zu erheblichem präparativen Aufwand.

Durch kombinatorische Manipulationen lassen sich viele analoge Reaktionen in einem einzigen Reaktionsschritt durchführen. So werden bei der Multiplex-PCR durch Zugabe mehrerer Primerpaare verschiedene DNA-Segmente aus einer biologischen Probe gleichzeitig in einem einzigen PCR-Ansatz amplifiziert. In einem solchen Ansatz verlagert sich das Detektionsproblem in der Regel auf die Dekonvolution des komplexen Sequenzgemisches.

Um die Anreicherung von unerwünschten Nukleinsäuren insbesondere bei der Untersuchung von stark unterrepräsentierten Sequenzen zu unterdrücken, bietet sich das Verfahren der nested PCR an. Dabei wird in einer Zwei-Schritt-Amplifikation unter Verwendung von zwei ineinander geschachtelten Primerpaaren die Spezifität verdoppelt.

Aufgabe der Erfindung:

Durch die vorliegende Erfindung sollen der hochparallele Proben-Durchsatz von Oligonukleotid-Chips, die Nachweis-Spezifität von templat-abhängigen Modifikationen sowie der hohe Informationsgewinn einer massenspektroskopischen Detektion in einer Multiplex-Analyse mit Hilfe von photolytisch ablesbaren Oligonukleotid-Sonden kombiniert werden.

Problemlösung durch die Erfindung:

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die multiplexen Nachweisreaktionen direkt auf dem DNA-Chip durchzuführen, wobei durch die definierte Positionierung der Oligonukleotid-Sonden gleichzeitig das komplexe Zielsequenz-Gemisch räumlich aufgetrennt wird. Zur Erhöhung der Spezifität soll der Nachweis durch enzymatische Modifikation der Oligonukleotid-Sonden in Abhängigkeit von den jeweiligen Zielsequenzen erfolgen. Eine kovalente Immobilisierung der Oligonukleotid-Sonden ermöglicht dabei die notwendigen Reaktionsbedingungen, insbesondere Temperatursprünge zur Hybridisierung der Zielsequenzen, denaturierende Lösungsmittel zur effizienten Abtrennung von kontaminierenden Nukleinsäurespuren und eines extremen pHs während der Aufnahme in einer MALDI-TOF-Matrix. Die Detektion erfolgt wegen des zusätzlichen Informationsgewinns bevorzugt durch Massenspektroskopie - insbesondere mit MALDI-TOF-MS -, was durch eine Photospaltstelle der Oligonukleotid-Sonden ermöglicht wird.

Unter photospaltbare Oligonukleotid-Sonden sind dabei 5-100 Nukleotide lange - bevorzugt 20-25 Nukleotide lange - Nukleinsäuren aus DNA, RNA, PNA oder deren Derivate zu verstehen, die zu einer Zielsequenz komplementär sind und die zu untersuchenden Nukleotide entweder in ihrer Mitte oder an einem Ende präsentieren oder genau bis zu dieser Stelle hybridisieren. Photospaltbare Oligonukleotid-Sonden enthalten zusätzlich eine Photospaltstelle, die durch Lichteinfluss selektiv gespalten werden kann, bevorzugt o-Nitrobenzyl-Gruppen. Zielsequenzen im Sinne der Erfindung sind genetische Bereiche, die relevante Mutationen enthalten können, bevorzugt einzelne Nukleotid-Positionen und deren flankierende Bereiche. Templat-abhängige Modifikationen sind vorzugsweise enzymatische Transformationen der Oligonukleotid-Sonden, die nur bei Hybridisierung einer bestimmten Zielsequenz stattfinden, so dass durch die Modifikationen der Sonden auf die Nukleotid-Zusammensetzung der Zielsequenz geschlossen werden kann. Oligonukleotid-Arrays im Sinne der Erfindung sind Oberflächen mit typischerweise 10-100000 - bevorzugt 100-1000 - räumlich definierten Bereichen, die jeweils mit einer Art von Oligonukleotid-Sonde funktionalisiert sind.

Es ist ein weiterer Grundgedanke der Erfindung, dass die Templat-abhängigen Nachweis-Modifikation und die massenspektroskopische Detektion auf derselben Oberfläche stattfinden. Ebenso kann die photolytische Freisetzung vom festen Träger und die Desorption der Matrix gleichzeitig durch Laserbeschuss erfolgen, sodass die einzelnen Positionen des photospaltbaren Oligonukleotid-Chips nacheinander - bevorzugt photolytisch - abgelesen werden können.

Ein Merkmal der Erfindung ist, dass die Oberflächen-Fixierung der photospaltbaren Sonden vor der Nachweis-Reaktion erfolgt, und dass bevorzugt die immobilisierten Oligonukleotid-Sonden und nicht die hybridisierten Zielsequenzen enzymatisch modifiziert werden.

Die Herstellung des Arrays der photospaltbaren Oligonukleotide kann einerseits durch Auftragen von konventionell synthetisierten Oligonukleotid-Konjugaten auf entsprechend präparierte Oberflächen erfolgen. Die hierzu nötigen Mikrofluidsysteme sind dem Fachmann bekannt. Oligonukleotid-Sonden im Sinne der Erfindung sind vorzugsweise kovalent auf der Oberfläche fixiert, bevorzugt über einen flexiblen Spacer - insbesondere Polyethylenglykol -, wobei die Verknüpfung bevorzugt am 3'- oder 5'-Terminus des Oligonukleotides ansetzt. Die bevorzugt verwendeten Oligonukleotid-Konjugate enthalten neben einer Photospaltstelle eine weitere reaktive, funktionelle Gruppe zur kovalenten Verknüpfung, insbesondere sind hier Biotin-, Amino-, Thiol-, Carboxyl- und Dien-Gruppen wie z.B. Anthracen zu nennen. Erfindungsgemäße Photospaltstellen sind bevorzugt lichtempfindliche o-Nitrobenzyl-

Einheiten, insbesondere, 1-o-Nitrophenyl-1,3-propan-diphosphate Ausgewählte Vertreter von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden sind in Figur 3 dargestellt.

Andererseits können die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden direkt auf der Oberfläche synthetisiert werden, entsprechende Vorschriften sind in der Fachliteratur beschrieben. Bei beiden Herstellungsverfahren kann die Photospaltstelle alternativ als eine flächendeckende Schicht auf den festen Träger aufgebracht werden, der dann an den entsprechenden Positionen mit weitergehend mit den gewünschten Oligonukleotiden beladen bzw. synthetisiert wird.

Unter der templat-gesteuerten Modifikation der Oligonukleotid-Sonden ist ihre enzymatische Veränderung gemäß einer hybridisierten Zielsequenz zu verstehen, wobei diese Veränderung nachträglich Auskunft über die Nukleotid-Zusammensetzung der Zielsequenz gibt. Es ist dabei ein Teil der Erfindung, dass die enzymatische Modifikation durch templat-abhängige Primerverlängerung der Oligonukleotid-Sonden realisiert wird. Dies schließt explizit eine Punktmutationsanalyse oder eine Kettenabbruchs-Sequenzierung mit Didesoxynukleotid-Triphosphaten ein.

Es ist ferner ein Grundgedanke der Erfindung, den enzymatischen Nachweis durch templat-abhängige DNA-Ligation zu verwirklichen, wobei die zu ligierenden Reporter-Oligonukleotide als kombinatorische Mischung zu der Nachweisreaktion zugegeben werden. Unter Reporter-Oligonukleotide sind 5-100 Nukleotide lang – bevorzugt 20-25 Nukleotide lange – Nukleinsäuren bevorzugt aus DNA, RNA, PNA oder deren Derivate zu verstehen, die zu einem den immobilisierten Oligonukleotid-Sonden benachbarten Abschnitt auf der jeweiligen Zielsequenz komplementär sind. Nur bei perfekter Basenpaarung an der Schnittstelle von Oligonukleotide-Sonden und -Reporter erfolgt die Ligation, sodass durch dieses Ereignis die Basenzusammensetzung der Zielsequenz an der Schnittstelle bestimmt werden kann. Es ist im Sinne der Erfindung, dass durch die zusätzliche Hybridisierung der Reporter-Oligonukleotide die Sequenzspezifität des Nachweises erhöht wird und dass so insbesondere auch Insertions- und Deletions-Mutanten nachgewiesen werden können. Es ist ein weiterführender Gedanke der Erfindung, dass die Reporter-Oligonukleotide eine zusätzliche Erkennungsgruppe tragen, die eine vereinfachte oder alternative Detektion erlauben. Dies schließt insbesondere Massen-, Fluoreszenz- oder Affinitätsmarker bzw. eine weitere lichtempfindliche Gruppe ein. Die Reporter-Oligonukleotide können zusätzlich stabilisierte oder neutralisierte Nukleotide zur effizienteren massenspektroskopischen Detektion enthalten.

Es ist ferner ein Grundgedanke der Erfindung, die Zusammensetzung der Zielsequenz durch templat-abhängige Nukleotid-Spaltung der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden zu

bestimmen. Dies schließt insbesondere einen templat-abhängigen Restriktionsverdau ein, mit dem bevorzugt das Methylierungsmuster der Zielsequenzen ermittelt werden kann. Dabei wird bevorzugt ein kombinatorisches Gemisch aus verschiedenen Restriktionsenzymen verwendet.

Die Erfindung bezieht sich auch auf Endonukleasen, die nur bei perfekter Basenpaarung oder bei partieller Fehlpaarung spalten. Eine bevorzugte Ausführung beinhaltet Oligonukleotid-Sonden mit einem einzelnen, internen Ribonukleotid, das nur bei perfekter Paarung mit dem zu untersuchenden DNA-Gegenstrang z.B. durch RNase H hydrolysiert wird.

Es ist eine bevorzugte Ausführung der Erfindung, ein Set von relevanten – bevorzugt aller – Punkt-, Insertions-, oder Deletions-Mutationen eines Patienten in einem einzigen Reaktionsschritt zu überprüfen. Dies umfasst insbesondere eine vorbereitende Vervielfältigung der relevanten Sequenzabschnitte durch multiplexe PCR mit äußeren Primerpaaren, eine Multiplex-Analyse durch Ligation von Reporter-Oligonukleotiden an photospaltbare Sonden sowie ein photolytisches Ablesen der Ligationsprodukte mit anschließender MALDI-TOF-Detektion. Oligonukleotid-Reporter und –Sonden liegen dabei explizit innerhalb des von den äußeren Primern eingeschlossenen Sequenzbereiches.

Eine weitere bevorzugte Ausführung der Erfindung besteht im multiplexen Resequenzieren bereits bekannter Genome zur Ermittlung von klinisch relevanten Mutationen.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1 stellt ein Ensemble von Zielsequenzen dar, die an den jeweiligen Positionen an die entsprechend komplementären Oligonukleotid-Sonden P_{1-n} hybridisieren. X_{1-n} symbolisieren die Nukleotide, die in der Multiplex-Analyse auf relevante Mutationen hin überprüft werden sollen. A_{1-n} und Z_{1-n} repräsentieren benachbarte Sequenzabschnitte, die zur Positionierung auf dem Oligonukleotid-Chip bzw. für die enzymatischen Nachweisreaktionen herangezogen werden. Das große Parallelogramm repräsentiert die Oberfläche des Chips, auf dem die Oligonukleotid-Sonden über die als Wellenlinie dargestellten Spacer kovalent immobilisiert sind. Die schwarzen Kreise entsprechen Photospaltstellen, die eine zielgerichtete Freisetzung durch Laserbestrahlung bei gleichzeitiger Detektion der modifizierten Oligonukleotid-Sonden durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie erlauben.

Figur 2 zeigt zwei Methoden zum enzymatischen Nachweis durch templat-abhängigen Modifikation der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden. a) Der Sequenzabschnitt Z_n einer

exemplarischen Zielsequenz hybridisiert an die komplementäre Oligonukleotid-Sonde P_n , die über einen als Wellenlinie dargestellten photospaltbaren Linker auf der festen Oberfläche (als Kugel dargestellt) kovalent immobilisiert ist. Anschließend wird diese gemäß des zu überprüfenden Nukleotides X_n durch eine DNA-Polymerase um das komplementäre Didesoxynukleotid Y_n verlängert. Die modifizierte Oligonukleotid-Sonde Y_nP_n wird anschließend durch photolytisch Spaltung der Photospaltstelle (schwarzer Kreis) freigesetzt und MALDI-TOF-massenspektroskopisch vermessen.

b) Insertions-, Deletions- oder Punkt-Mutations-Analyse durch templat-abhängige DNA-Ligation: Der Sequenzabschnitt X_nZ_n einer Zielsequenz lagert sich an die immobilisierte Oligonukleotid-Sonde Y_nP_n an, während das Reporter-Oligonukleotid B_n an den benachbarten Sequenzabschnitt A_n hybridisiert. Entspricht das zu überprüfende Zielnukleotid X_n nicht dem Sondeterminus Y_n , so kann keine Ligation stattfinden, gleiches gilt, wenn X_n eliminiert ist. Insertions-Mutanten, bei denen X_n ein zusätzliches Nukleotid darstellt, können ebenso durch Ligation von Y_nP_n -Oligonukleotid-Sonden identifiziert werden.

In Figur 3 sind exemplarisch zwei potentielle photospaltbare Oligonukleotid-Sonden dargestellt. Beide enthalten jeweils einen 19 Nukleotide langen DNA-Teil für den enzymatischen Nachweis durch templat-abhängige Modifikation und eine o-Nitrobenzyl-Einheit zur gezielten Photospaltung. Diese ist von flexiblen Hexa- bzw. Polyethylenglykol-Spacern eingefasst, die eine ungehinderte Zugänglichkeit für hybridisierende Zielsequenzen oder modifizierende Enzyme gewährleisten. Beide Oligonukleotid-Sonden enthalten ferner eine funktionelle Gruppe, die eine Immobilisierung auf einem Festphasenträger ermöglichen:

a) Anthracen als Dien in einer Diels-Alder-Reaktion mit geeigneten Dienophilen, z.B. Maleimid. b) eine primäre Amino-Gruppe zur Reaktion mit geeigneten Aktiv-Estern, z.B. NHS-Ester. In c) ist ein o-Nitrobenzyl-Phosphoramidit gezeigt, das zur Generierung der Photospaltstelle innerhalb der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden verwendet werden kann.

Figur 4a) zeigt in die MALDI-TOF-massenspektroskopische Analyse der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonde aus Figur 3a). Als dominierender Peak bei $m/z = 6189,9$ ist das Signal des photolytisch freigesetzten Oligonukleotid-Fragmentes zu erkennen (berechnet: $[M+H]^+ = 6190,0$ g/mol). Nur noch in Spuren ist der Molmassenpeak der unzersetzten Oligonukleotid-Sonde zwischen 7036,2-7300,0 g/mol zu sehen, der wegen des polydispersen Polyethylenglykol-Spacers in mehrere Peaks aufspaltet.

b) Immobilisierung und photolytische Freisetzung von photospaltbaren Nukleinsäure-Konjugaten: Weiße Balken = gelöste Nukleinsäure; schwarze Balken = immobilisierte Nukleinsäure; Bahn 1 = eingesetztes, radioaktiv markiertes, photospaltbares Nukleinsäure-Konjugat; Bahn 2 = immobilisierte Fraktion nach intensivem, denaturierenden Waschen; Bahn 3 = photolytische Freisetzung der immobilisierten Nukleinsäure (schwarzer Balken aus Bahn 2).

Ausführungsbeispiele:

a) Multiplexe Mutationsanalyse

Zunächst werden für jede zu untersuchende Mutationsstelle je zwei äußere Amplifikations-Primer und ein Reporter-Oligonukleotid durch klassische Festphasensynthese synthetisiert, wobei jeweils einer der Amplifikationsprimer 5'-terminal mit Biotin derivatisiert ist.

Zur Herstellung des Array aus photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden wird zunächst eine DMTr-Polyethylenglykol-funktionalisierte Glasoberfläche mit Trichloressigsäure entschützt und dann flächendeckend mit Tetrazol und einer 0,1M Acetonitril-Lösung des in Figur 3c) dargestellten Photo-Phosphoramidit behandelt. Nach wiederholtem Waschen mit Acetonitril werden die nicht reagierte funktionelle Gruppen mit Acetanhydrid, Lutidin und 1-Methylimidazol in THF blockiert, gefolgt von einer Behandlung mit einer 1M Jod-Lösung in Pyridin/THF/Wasser. Auf diese o-Nitrobenzyl-derivatisierte Oberfläche werden durch einen dem Fachmann bekannten Oberflächen-Syntheseroboter an den jeweiligen Positionen die entsprechenden Oligonukleotid-Sequenzen wie in dem in Figur 1 dargestellten Format synthetisiert. Diese werden abschließend flächendeckend durch eine 0,1M Biscyanoethyl-N,N-diisopropyl-phosphoramidit-Lösung (in CH_3CN) chemisch phosphoryliert. Zur Entschütung der photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden wird der Chip über Nacht bei 55°C mit 33% NH_4OH behandelt.

Aus einer biologischen Probe eines Patienten, z.B. einer Haarwurzel oder einem Blutropfen, wird nach Standardmethoden das genetische Material isoliert. In einem einzigen Reaktionsansatz werden alle Zielsequenzen mit dem Set der äußeren Primerpaare durch Multiplex-PCR vervielfältigt. Über die biotinylierten Primer werden die Amplifikationsprodukte an einer Streptavidin-Agarose-Festphase aufgereinigt. Durch Waschen mit 0,1M Natronlauge werden die Gegenstränge in Lösung gebracht, nach Neutralisation mit einem Set von Reporter- Oligonukleotiden vermischt und dann auf dem Chip aufgetragen (siehe Figur 1). Bei einer Endkonzentration von 20mM Tris/HCl (pH=8,3), 50mM KCl, 10mM MgCl_2 , 10mM DTT, 1mM EDTA, 1mM NAD, 0,1% Triton X-100 und

1U Tth DNA Ligase werden die Ligationsreaktionen wie in Figur 2b) dargestellt mit 20 Zyklen à 30 Sekunden bei 95°C, 1 Minute bei 50°C und 5 Minuten bei 70°C durchgeführt. Anschließend wird der Chip wiederholt mit 25% DMSO und 0,2M Ammoniumhydroxid-Lösung gewaschen und abschließend mit einer 1mm dicken Schicht einer 3-Hydroxypicolinsäure-Lösung bedeckt, die zur Trockene eingedampft wird. Mit einem Nd-YAG-Laser werden nun bei $\lambda=355\text{nm}$ die einzelnen Punkte auf dem Chip nacheinander angeregt und die freigesetzten Oligonukleotid-Sonden (vergl. Figur 4b)) wie in Figur 4a) MALDI-TOF-massenspektrometrisch vermessen. Die Signale werden durch eine integrierte Software auf klinisch relevante Mutationen hin ausgewertet. Alle Teilschritte des Verfahrens sind automatisierbar.

b) Multiplexe Resequenzierung an fester Phase

Zur multiplexen Sequenzierung verschiedener Sequenzbereiche einer genetischen Probe wird zunächst ein Set an photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden durch klassische Festphasensynthese synthetisiert. Diese sind so gewählt, dass je eine Sonde im Abstand von 50 Nukleotiden an die Zielsequenz hybridisieren kann, wobei sich die Sonden für Strang und Gegenstrang nicht überschneiden. Die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden sind wie in Figur 3a) aufgebaut, das Anthracen-Polyethylenglykol, der Hexaethylenglykol-Spacer sowie die photospaltbare o-Nitrobenzyl-Einheit werden als entsprechend derivatisierte Phosphoramidite eingebaut. Mit den Stammlösungen dieser Oligonukleotide können nun weit über 10000 multiplexe Sequenzier-Reaktionen der genetischen Zielsequenz durchgeführt werden.

Eine Amino-derivatisierte Oberfläche wird nun gleichmäßig durch Behandlung mit 0,1M Maleinimidylhexanoat-NHS-Ester in DMF flächendeckend funktionalisiert. Auf diese Maleinimid-Oberfläche werden durch einen kommerziell erhältlichen Gen-Spotting-Roboter die Anthracen-funktionalisierten Oligonukleotid-Sonden (Analoge von 3a)) als 10nl-Volumina in einem Arrayformat pipettiert. Dieser in Figur 1 gezeigte Chip wird nach Übernacht-Inkubation durch intensives Waschen von nicht immobilisierten Oligonukleotid-Sonden befreit.

Aus einer biologischen Probe wird nun ein 250.000 Basenpaare enthaltender genetischer Bereich durch Klonierung vervielfältigt und nach Standardmethoden aufgereinigt. Die erhaltene DNA wird auf vier der oben beschriebenen Chips verteilt und mit einer Sequenziermischung (Sequenase, dATP, dGTP, dCTP, dTTP sowie je ein ddNTP) versetzt. Nach 30 Zyklen à 15 Sekunden bei 95°C, 15 Sekunden bei 55°C und 30 Sekunden bei 72°C

BELEGEXEMPLAR

Darf nicht geändert werden

16

wird der Chip wiederholt mit 25% DMSO und 0,2M Ammoniumhydroxid-Lösung gewaschen und abschließend mit einer 1mm dicken Schicht einer 3-Hydroxypicolinsäure-Lösung bedeckt, die zur Trockene eingedampft wird. Mit einem Nd-YAG-Laser werden nun bei $\lambda=355\text{nm}$ die einzelnen Punkte auf dem Chip nacheinander angeregt und die freigesetzten Oligonukleotid-Sonden (vergl. Figur 4b)) wie in Figur 4a) MALDI-TOF-massenspektrometrisch vermessen. Die gemessenen Sequenzierleitern der jeweiligen Terminator-Nukleotide werden durch eine integrierte Software ausgewertet, wobei die Terminationsprodukte durch die detektierten Massen überprüft und ggf. korrigiert werden. Nach Korrelation der Strang- und Gegenstrang-Ergebnisse wird die erhaltene Gesamt-Sequenz mit bereits bekannten Daten verglichen und so die abweichenden Mutationen ermittelt.

Patent-Ansprüche:

1. Verfahren zur massenspektroskopischen Analyse von Nukleinsäuren mit Hilfe eines räumlich definierten Oligonukleotid-Chip oder -Array **dadurch gekennzeichnet, daß** ein komplexes Gemisch von Sequenzen gleichzeitig und parallel untersucht wird, indem ein Set von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden zunächst in einem einzigen Reaktionsschritt in einer für die jeweiligen Zielsequenzen charakteristischen Weise modifiziert wird und anschließend durch ortsgerichtete Bestrahlung massenspektroskopisch vermessen werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Zielsequenzen vor der Analyse in einer Eintopf-Reaktion vervielfältigt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die kovalente Immobilisierung der Sonden auf einem festen Träger diese nach der Modifizierung durch intensives, ggf. denaturierendes Waschen gereinigt und von störenden Nukleinsäure-Kontaminationen befreit werden können.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch Bestrahlung der Sonden diese nach Modifizierung und Aufreinigung freigesetzt und somit massenspektroskopisch untersucht werden können.
5. Verfahren nach Anspruch 4 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die Photospaltstelle der Sonden diese in einer räumlich definierten Weise durch Laserbestrahlung angesteuert und vermessen werden können.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5 **dadurch gekennzeichnet, daß** die massenspektroskopische Detektion durch MALDI-TOF erfolgt.
7. Verfahren nach dem Anspruch 6 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photolytische Abspaltung der Oligonukleotid-Sonden von der festen Oberfläche gleichzeitig während deren Desorption und Ionisierung stattfindet.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche **dadurch gekennzeichnet, daß** die Sonden auf einer für MALDI-TOF-Massenspektroskopie geeigneten Oberfläche immobilisiert sind, **daß** an dieser Oberfläche die Modifizierung der Sonden stattfindet und **daß** die photolytische Freisetzung während der MALDI-TOF-Messung stattfindet.

9. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Modifizierung der photospaltbaren Sonden durch eine templat-abhängige Primerverlängerung erfolgen kann.

10. Verfahren nach Anspruch 9 **dadurch gekennzeichnet, daß** bei der templat-abhängigen Primerverlängerung der photospaltbaren Sonden mindestens ein Didesoxynukleotid eingesetzt wird

11. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Modifizierung der photospaltbaren Sonden durch eine templat-abhängige Ligation mit geeigneten Reporter-Oligonukleotiden erfolgen kann.

12. Verfahren nach Anspruch 11 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die Sequenz der Reporter-Oligonukleotide die Templat-Spezifität der Ligation zusätzlich erhöht wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch die zusätzlich Templat-Spezifität der Reporter-Oligonukleotide insbesondere Insertions- und Deletions-Mutations-Analysen möglich sind.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Reporter-Oligonukleotide eine zusätzliche Erkennungsgruppe tragen können.

15. Verfahren nach Anspruch 14 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Erkennungsgruppe aus einem Massen-, Fluoreszenz-, Affinitäts-Marker oder einer photoaktiven Gruppe besteht.

16. Verfahren nach Ansprüchen 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Modifizierung der photospaltbaren Sonden durch eine templat-abhängige, endonukleolytische Spaltung erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 16 **dadurch gekennzeichnet, daß** die endonukleolytische Spaltung durch Restriktionsenzyme erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch templat-abhängigen Restriktionsverdau der photospaltbaren Sonden die Methylierungsmuster der Zielsequenzen nachgewiesen werden können.
19. Verfahren nach Anspruch 16 **dadurch gekennzeichnet, daß** die endonukleolytische Spaltung durch Einzelstrang-spezifische Nukleasen erfolgt.
20. Verfahren nach Anspruch 16 oder 19 **dadurch gekennzeichnet, daß** durch templat-abhängigen Nukleaseverdau der photospaltbaren Sonden einzelsträngige Fehlpaarungen der Hybride aus Sonden und Zielsequenzen identifiziert werden können.
21. Verfahren nach Anspruch 16 **dadurch gekennzeichnet, daß** die endonukleolytische Spaltung durch Doppelstrang-spezifische Nukleasen erfolgt.
22. Verfahren nach Anspruch 21 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Doppelstrang-spezifische Nuklease RNase H ist.
23. Verfahren nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden mindestens ein Ribonukleotid enthalten können.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21-23 **dadurch gekennzeichnet, daß** nur bei perfekter Basenpaarung die Ribonukleotide der photospaltbaren Sonden templat-abhängig verdaut werden können, wodurch die Fehlpaarung in den photospaltbaren Sonden nachgewiesen werden kann.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-24 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Hybridisierung der Zielsequenzen an die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden und deren templat-abhängige Modifizierung mehrfach hintereinander durchgeführt wird.
26. Verfahren nach Anspruch 25 **dadurch gekennzeichnet, daß** die verwendeten Enzyme thermostabil sind und daß der Nachweis-Reaktionsansatz direkt auf dem Chip wiederholt erwärmt wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8 **dadurch gekennzeichnet, daß** der Nukleinsäure-Chip aus einer Oberfläche mit 10-100000 räumlich definierten, photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden besteht.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 4, 5 oder 27 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Photospaltstelle aus einer o-Nitrobenzyleinheit besteht.
29. Verfahren nach Anspruch 27 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden zusätzlich über einen Spacer an die Oberfläche geknüpft sind, dergestalt, daß die enzymatische Modifikation der Sonden erleichtert wird.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27-29 **dadurch gekennzeichnet, daß** die Sonden als photospaltbare Oligonukleotid-Konjugate im Array-Format auf der Oberfläche immobilisiert werden.
31. Verfahren nach dem Anspruch 30 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Konjugate zur Immobilisierung ein zusätzliche Funktionalität tragen.
32. Verfahren nach dem Anspruch 31 **dadurch gekennzeichnet, daß** die zusätzliche Funktionalität aus einer Amino-, Schwefelwasserstoff-, Carboxyl-Gruppe, Biotin, Anthracen oder einem Dien besteht.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 27-29 **dadurch gekennzeichnet, daß** die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden direkt auf der Oberfläche synthetisiert werden.
34. Verfahren nach Anspruch 33 **dadurch gekennzeichnet, daß** zunächst einheitlich die Photospaltstellen und ggf. die Spacer synthetisiert werden.
35. Nukleinsäure-Chips mit photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden nach einem der vorangegangenen Ansprüchen 1 oder 27-34

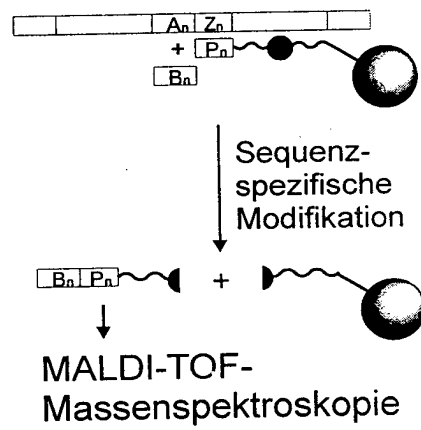
Multiplex-Analyse von DNA-Gemischen mittels photolytisch ablesbarer DNA-Chips

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die gleichzeitige Analyse von Nukleinsäure-Sequenzen innerhalb eines komplexen Nukleinsäure-Gemisches mit Hilfe von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden. Diese erlauben hochparallele und dennoch sequenzspezifische Nachweisreaktionen in einem einzigen Reaktionsansatz. Da die photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden in einer räumlich definierten Weise – z.B. in Form eines Arrays – auf einer Oberfläche platziert sind, kann jede Position auf dem Oligonukleotid-Chip einer bestimmten Zielsequenz zugeordnet werden. Da die photospaltbaren Sonden kovalent auf der festen Oberfläche immobilisiert sind, kann die Nachweisreaktion direkt auf dem Chip unter Erhalt des Sonden-Positions-Musters durchgeführt werden. Durch einen lichtempfindlichen Baustein innerhalb der Sonden können diese nach der Nachweisreaktion photolytisch angesteuert und so einer massenspektroskopischen Analyse zugeführt werden.

BELEGEXEMPLAR
Darf nicht geteilt werden

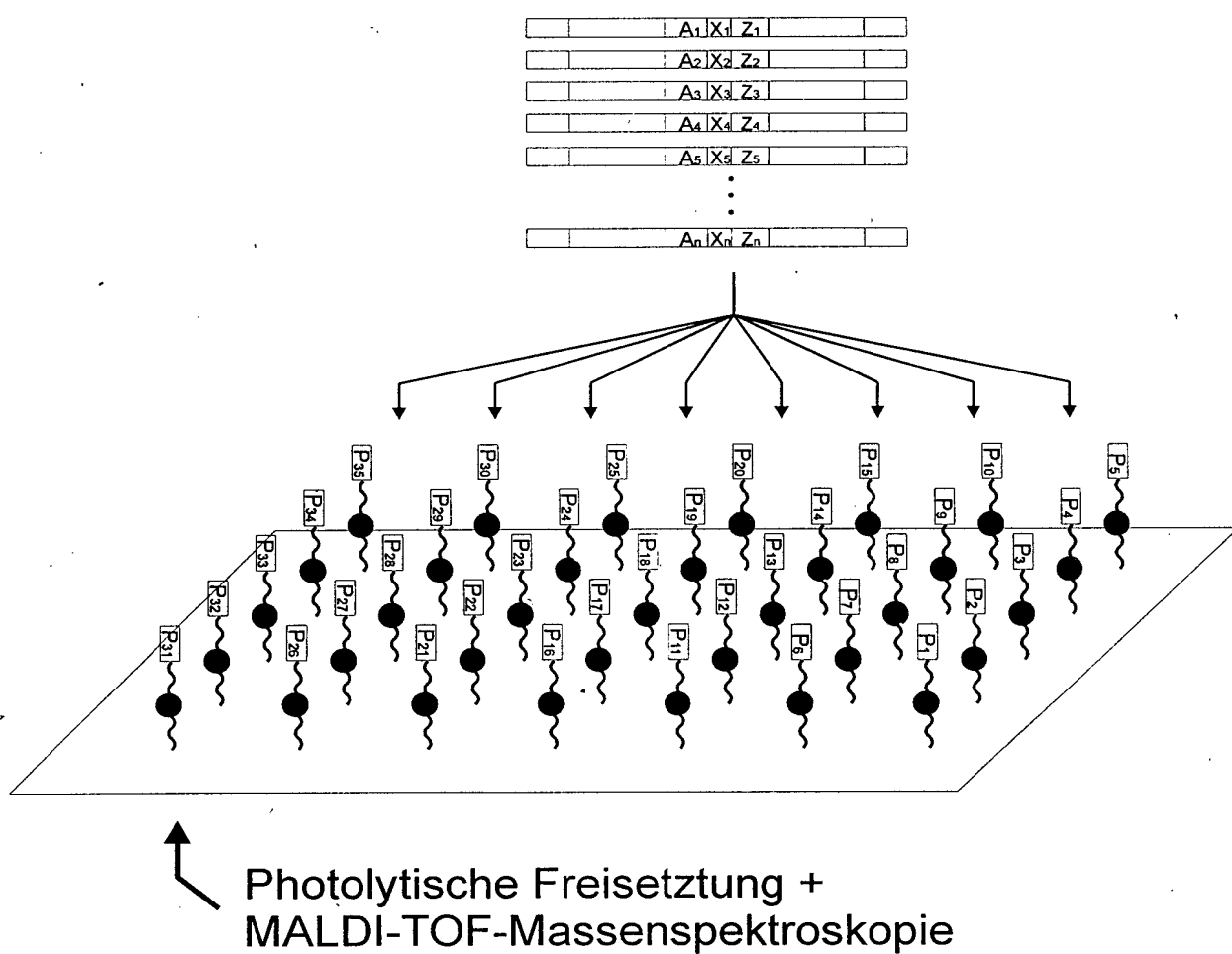
Erklärende Abbildung zur Zusammenfassung



SELEGELEMPLAR
nicht verändert werden

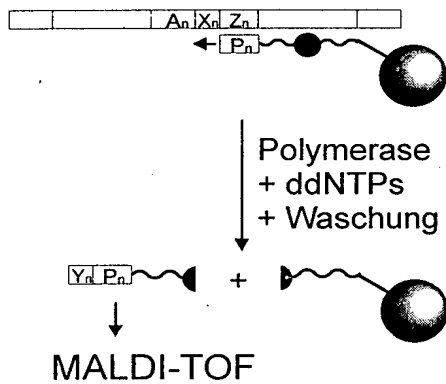
Figur 1

Multiplex-Analyse eines Nukleinsäure-Gemisches mit Hilfe eines photospaltbaren Oligonukleotid-Array

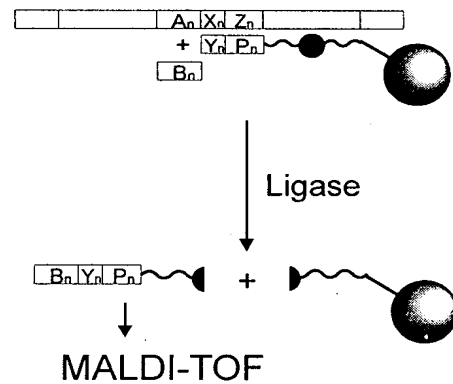


Figur 2 Massenspektroskopische Analyse
 nach Modifikation der Sonden

a) Primer-Verlängerung

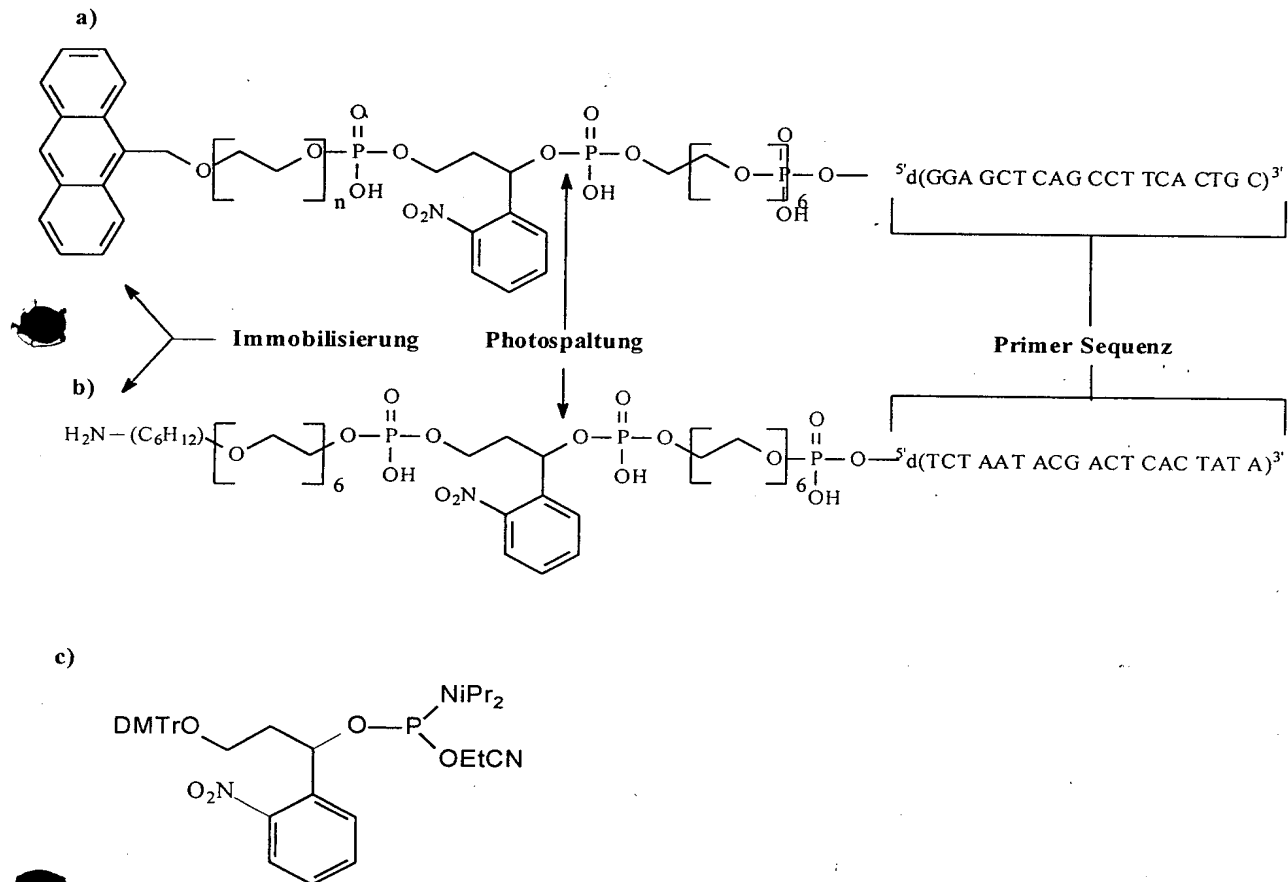


b) Templat-abhängige
 Ligation



BT-2000-AR
Darf nicht geändert werden.

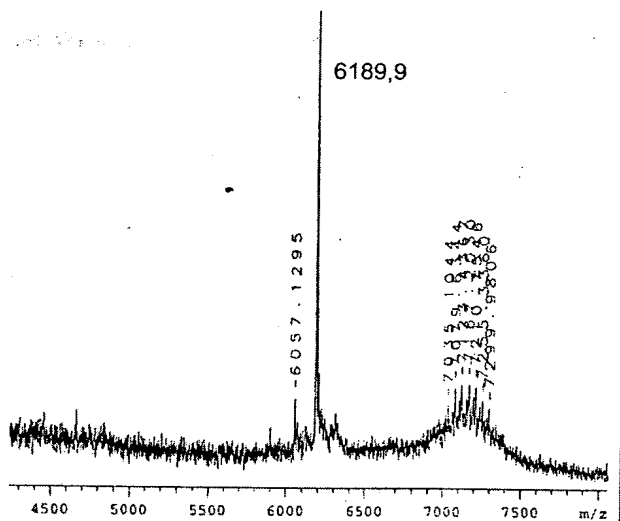
Figur 3 Design von photospaltbaren Oligonukleotid-Sonden



Figur 4

BELEGEXEMPLAR
Darf nicht geändert werden

a)



b)

[cpm]

